

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Petr Výmola**

Mechanismy neovaskularizace v glioblastomu

Mechanisms of neovascularization in glioblastoma

Bakalářská práce

Školitel: MUDr. Eva Balážiová, Ph.D.

Praha 2017

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne: 14. 5. 2017

Petr Výmola

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval MUDr. Evě Balážiové Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích bakalářské práce. Také děkuji celému kolektivu v laboratoři a mým blízkým za podporu při psaní této práce.

## **Abstrakt**

Neovaskularizace je nezbytnou součástí fyziologického vývoje živých mnohobuněčných organismů. Umožňuje jedinci růst a vyvíjet se tím, že zprostředkovává tkáním přísun živin a kyslíku. Ze stejného důvodu je nedílnou součástí progresu nádorů, které ke svému růstu také potřebují živiny. Proto je v současné době neoplasmatická neovaskularizace zkoumána jako jeden z možných cílů protinádorové terapie. Nádor s jednou z nejvyšších úrovní vaskularizace je glioblastom multiforme, nejčastější primární nádor mozku. Cílem bakalářské práce je v první řadě shrnout principy fyziologické neovaskularizace se zaměřením na proces angiogeneze a poskytnout přehled faktorů, které je ovlivňují. V další části práce je pozornost kladena na popis specifických patologických mechanismů neovaskularizace v glioblastomu multiforme a je poskytnut stručný přehled aktuálních možností antiangiogenní terapie.

**Klíčová slova:** neovaskularizace, angiogeneze, růstové faktory, vaskulární endotelový růstový faktor, glioblastom, endotelové buňky

## **Abstract**

Neovascularization processes are crucial components for proper development of multicellular organisms. They are necessary part of body growth. Because of them, body tissues are supplied by nutrition and oxygen. Unfortunately in the same way like in the healthy body these processes also help in tumor growth and progression. That is the reason why neoplastic neovascularization is being investigated as a possible target of antitumor therapies. One of the greatest level of tumor vascularization is associated with glioblastoma, the most common primary tumor of human brain. There are several aims of this thesis. First of all, discuss mechanisms of neovascularization under physiological conditions and introduce factors which are involved in this complex process. Second part of this thesis paid attention on specific glioblastoma neovascularization mechanisms and provides a brief overview of possible antiangiogenesis therapeutic approaches.

**Key words:** neovascularization, angiogenesis, growth factors, vascular endothelial growth factor, glioblastoma, endothelial cells

## Seznam použitých zkratk

<b>ANG-1-2</b>	Angiopoetin 1,2
<b>CNS</b>	Centrální nervová soustava
<b>DLL4</b>	Delta-like-4
<b>EC</b>	Endotelové buňky
<b>ECM</b>	Extracelulární matrix
<b>EPC</b>	Progenitor endotelových buněk
<b>EGFR</b>	Receptor epidermálního růstového faktoru
<b>FGF</b>	Fibroblastový růstový faktor
<b>FGFR</b>	Receptor fibroblastového růstového faktoru
<b>GBM</b>	Glioblastom
<b>GSC</b>	Gliomové kmenové buňky
<b>FAP</b>	Fibroblastový aktivační protein
<b>FISH</b>	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
<b>HGF</b>	Hepatocytární růstový faktor
<b>HIF-1</b>	Hypoxií indukovaný faktor 1
<b>IDH</b>	Izocitrát dehydrogenáza
<b>MMP</b>	Matrix-metalo proteinázy
<b>N-kadherin</b>	Neurální kadherin
<b>PDGF</b>	Růstový faktor krevních destiček
<b>PDGFR</b>	Receptor růstového faktoru krevních destiček
<b>S1P</b>	Sfingozin-1-fosfát
<b>S1PR</b>	Sfingozin-1-fosfátový receptor
<b>TAM</b>	S tumorem asociované makrofágy
<b>TEM</b>	Tie2 exprimující monocyty
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transformující růstový faktor $\beta$
<b>TIE-2</b>	Receptor angiopoetinu-1,2
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor nekrotizující faktor $\alpha$
<b>VE-kadherin</b>	Vaskulární kadherin
<b>VEGF</b>	Vaskulární endotelový růstový faktor
<b>VEGFR</b>	Receptor vaskulárního endotelového faktoru
<b>WHO</b>	Světová zdravotnická organizace
<b><math>\alpha</math>SMA</b>	$\alpha$ -aktin hladkého svalu

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Nádory centrální nervové soustavy</b>	<b>1</b>
2.1	Gliomy	2
2.1.1	Glioblastom multiforme	2
<b>3</b>	<b>Fyziologická neovaskularizace</b>	<b>3</b>
3.1	Vaskulogeneze	3
3.2	Angiogeneze	3
3.2.1	Angiogeneze pučením	4
3.2.1.1	Enzymatická degradace	4
3.2.1.2	Změna endoteliálního fenotypu	4
3.2.1.3	Migrace a proliferace endotelových buněk	5
3.2.1.4	Tubulogeneze	6
3.2.1.5	Rekrutování pericytů a stabilizace cév	6
3.2.2	Angiogeneze intususcepcí	8
<b>4</b>	<b>Angiogenní faktory</b>	<b>9</b>
4.1	Vaskulární endoteliální růstový faktor	9
4.2	Fibroblastový růstový faktor	9
4.3	Růstový faktor krevních destiček	10
4.4	Transformující růstový faktor $\beta$	10
4.5	Hepatocytární růstový faktor	10
4.6	Další angiogenní faktory	11
<b>5</b>	<b>Mechanismy neovaskularizace v glioblastomech</b>	<b>11</b>
5.1	Vaskulární koopce	11
5.2	Angiogeneze pučením asociovaná s GBM	12
5.3	Vaskulogeneze asociovaná s GBM	13
5.4	Vaskulární mimikry	13
5.5	Glioblastom-endotelová transdiferenciace	14
5.6	Angiogenní faktory v glioblastomu	16
<b>6</b>	<b>Inhibice angiogeneze jako možný terapeutický přístup u GBM</b>	<b>17</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b>	<b>18</b>
<b>8</b>	<b>Použitá literatura</b>	<b>20</b>

# 1 Úvod

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí ve vyspělých zemích. Mezi nádory s velmi špatnou prognózou se řadí nádory centrální nervové soustavy. Ačkoli řada z nich ze své biologické podstaty nevykazuje rychlý, agresivní růst, prognóza pacientů je v důsledku jejich lokalizace v limitovaném prostoru lebky často velmi špatná. Tak i nádor se zdánlivě biologicky benigním chováním může pacienta usmrtit nebo těžce invalidizovat.

Nejčastějšími primárními nádory mozku jsou gliomy, a to především jejich nejagresivnější forma glioblastoma multiforme. Tento nádor, vznikající z podpůrných mozkových buněk - glií, se vyznačuje vysokou buněčnou heterogenitou a abnormálním cévním zásobením (shrnuje v Louis et al., 2016). Glioblastom patří mezi nejvíce vaskularizované nádory vznikající v lidském těle a aberace, které vaskulární síť GBM postihují, jsou natolik charakteristické, že jsou považovány za jedno z histologických diagnostických kritérií. Na vzniku cévního systému glioblastomů se podílí několik neovaskularizačních procesů. S přihlédnutím k tomuto faktu byly mechanismy neovaskularizace glioblastomu intenzivně studovány v naději na vyvinutí účinné protinádorové strategie. Bohužel v současnosti používaná léčiva s antiangiogenní účinkem nesplnili očekávání a nemají vliv na celkové přežití pacientů.

## 2 Nádory centrální nervové soustavy

Onemocnění, postihující centrální nervovou soustavu (CNS), jsou příčinou často trvalé invalidity a vysoké mortality pacientů. Nádory CNS zastávají 17. místo v míře výskytu nádorových onemocnění. Celosvětově je každoročně diagnostikováno přes 250 000 nových případů nádorových onemocnění mozku (Ferlay et al., 2015).

V rámci CNS se vyskytuje několik různých buněčných typů, ze kterých vznikají takzvané primární nádory. Vzhledem k velké inter i intranádorové buněčné heterogenitě bylo potřeba ustálit jejich histopatologickou klasifikaci. Ta byla vypracována v gesci organizace WHO, napomáhá a zrychluje proces rozlišení jednotlivých nádorů a tím zvyšuje šanci na úspěšnou léčbu onemocnění. Stávající klasifikace z roku 2016 (Louis et al., 2016) oproti té předchozí, (Louis et al., 2007) již zohledňuje mimo tradiční histopatologii tkáně také nové poznatky z molekulární biologie nádorů, čímž se do budoucna otevírá cesta k přesnějšímu cílení a personalizaci terapie pro konkrétního pacienta a typ onemocnění.

V rámci jednotlivých histologických typů nádorů se určuje stupeň agresivity biologického chování (z anglického grade). Jednotlivé nádory jsou tak rozděleny do 4 stupňů



(gradů) (I.- IV.) podle své agresivity. Samostatnou kapitolu představují tzv. sekundární nádory mozku, které zahrnují metastázy solidních nádorů.

Z histopatologického hlediska WHO rozděluje nádory CNS do několika skupin: Neuroepiteliální nádory, nádory paraspinálních a kraniálních nervů, nádory mozkových obalů, nádory selární oblasti a germinálních buněk, lymfomy a hematopoetické neoplázie. Pro účely bakalářské práce dále ve stručnosti popisují pouze jeden typ neuroepiteliálních nádorů, a to gliom IV stupně Glioblastom multiforme (GBM).

## **2.1 Gliomy**

Gliomy se podle klasifikace WHO řadí mezi neuroepiteliální nádory. Jedná se o nejčastější primární nádory mozku vznikající z gliálních buněk. Podle typu gliálních buněk dělíme gliomy na: astrocytomy z astrocytů, oligodendrogliomy z oligodendroglíí a ependymomy z ependymu, a nádory smíšené obsahující různé zastoupení jednotlivých buněčných populací.

Hlavním znakem gliomů obecně je jejich infiltrativní růst, který je činí těžko odstranitelnými. Prvními symptomy tohoto onemocnění jsou například bolest hlavy, zvracení a epileptické záchvaty.

### **2.1.1 Glioblastom multiforme**

Jedná se o nejagresivnější astrocytom (stupeň IV dle WHO) a zároveň i nejčastěji se vyskytující primární nádor mozku dospělých s maximem incidence kolem 45-70 roku života. Dle nové klasifikace glioblastomy rozdělujeme do dvou skupin: izocitrát dehydrogenáza (IDH)-nemutovaný typ a IDH-mutovaný typ. Nádory patřící do skupiny IDH-mutovaný typ se ale vesměs shodují s dříve histopatologicky definovanou skupinou - sekundárních GBM. Zatímco IDH-nemutovaný typ pod sebe zahrnuje nádory dříve označované jak tzv. primární GBM. Sekundární GBM vzniká malignizací gliomů nižšího stupně, zatímco primární GBM vzniká *de novo*. Při využití veškeré dostupné léčby je medián přežití u pacientů s IDH-nemutovaným typem GBM 15 měsíců (shrnutí v Louis et al., 2016).

GBM se vyznačují vysokou buněčnou heterogenitou. Typický je výskyt nekrotických oblastí a cyst v rámci tumoru. Základním znakem glioblastomu je také mohutná, výrazně aberantní vaskularizace, vyúsťující až v hemoragii (shrnutí v Ohgaki et al., 2013).

I přesto, že se na novotvorbě cév v glioblastomu podílejí specifické mechanismy, tak hlavním neovaskularizačním procesem kterým si GBM nové cévy vytváří, zůstává angiogeneze. Patologická angiogeneze se v mnohém podobá té fyziologické a proto se v

následující části práce budu věnovat nejprve popisu neovaskularizačních procesů v průběhu fyziologického vývoje člověka a poté se pokusím přiblížit neovaskularizaci GBM.

### 3 Fyziologická neovaskularizace

Neovaskularizace patří mezi základní procesy fyziologického vývoje a růstu organismů. Díky těmto procesům vznikají již v embryonálním vývoji nové cévy, které přivádí do tkání a orgánů potřebné živiny, kyslík a také zajišťují odsun odpadních látek. Fyziologická neovaskularizace je souborem dvou dějů: **vaskulogeneze**, při které dochází k tvorbám cév *de novo* a **angiogeneze**, procesu tvorby cév, z cév již vytvořených (Ausprunk & Folkman, 1977).

#### 3.1 Vaskulogeneze

Kardiovaskulární systém je jedním z prvních orgánových systémů, který se v průběhu embryonálního vývoje vytváří. Prvním krokem vzniku tohoto systému je proces vaskulogeneze.

Vaskulogeneze začíná diferenciací mesodermálních hemangioblastů na angioblasty (McLeod et al., 2012). Angioblasty jsou poté aktivovány růstovými faktory- například vlivem růstového faktoru fibroblastů 2 (FGF-2) získávají promigrační fenotyp a účinkem vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF) je stimulován jejich růst (Poole et al., 2001). Takto aktivované progenitory vytváří krevní ostrůvky, ve kterých dochází k jejich další diferenciaci na endotelové buňky (EC) a k tvorbě prvních cév *de novo* (shrnutí v Schmidt et al., 2007). Dlouhou dobu se předpokládalo, že proces vaskulogeneze je omezený pouze na embryonální vývoj, nicméně posléze bylo prokázáno, že tímto způsobem, ačkoli v menší míře, dochází k vytváření cév za fyziologických i patologických podmínek během postnatálního života (Asahara et al., 1999).

#### 3.2 Angiogeneze

Jakmile dojde v embryonálním vývoji k vzniku prvotních cév procesem vaskulogeneze, přebírá angiogeneze roli v dalším rozvoji cévního systému. Angiogeneze jako vznik cév z cév stávajících byl poprvé popsán v embryonálním vývoji. V postnatálním životě se angiogeneze fyziologicky uplatňuje v řadě procesů, například při hojení ran (shrnutí v Eming et al., 2007) nebo v průběhu menstruačního cyklu u žen (shrnutí v Demir et al., 2010). Angiogeneze je také nezbytná pro tvorbu vaskulárního systému v nově vznikajících tukových tkáních (shrnutí v Cao, 2007). Je dominantním mechanismem vývoje cév v postnatálním životě.

Angiogeneze probíhá dvěma základními mechanismy: prvním, kdy se nové cévy vytváří pučením z cév stávajících (Ausprunk & Folkman, 1977) nebo druhým, při kterém dochází k rozdělení původní cévy na dvě nové (Caduff et al., 1986).

### **3.2.1 Angiogeneze pučením**

Základními kroky angiogeneze pučením (sprouting angiogenesis) jsou: enzymatická degradace bazální membrány endoteliemi původní cévy, změna endoteliálního fenotypu, proliferace a migrace endotelových buněk vytvořením útvarů podobných pupenům, jejich tubulizaci (tubulogeneze, vznik lumen cév) a finální stabilizace cévní stěny murálními buňkami (Ausprunk & Folkman, 1977).

Spouštěcím faktorem angiogeneze je nízký obsah kyslíku ve tkáni, kdy díky buňkám parenchymu, které mají mechanismy citlivě reagující na hypoxii, dochází k uvolňování hlavního proangiogenního faktoru: VEGF. Děje se tak na základě aktivace hypoxií-indukovaného transkripčního faktoru HIF-1, který poté reguluje expresi VEGF (Forsythe et al., 1996).

#### **3.2.1.1. Enzymatická degradace**

Stěna kapilár je složena z bazální membrány obsahující extracelulární proteiny, na kterou z vnější strany naléhají pericyty a vnitřní je pokryta endotelovými buňkami (shrnutí v Eble & Niland, 2009). Hlavní funkcí pericytů je stabilizace cév způsobená interakcí mezi nimi a endoteliemi. Prvotní fází pučení je z tohoto důvodu odpoutání pericytů od bazální membrány. Toto odpoutání je řízeno působením angiopoetinu-2 (ANG-2) (Maisonpierre et al., 1997) a degradací bazální membrány.

K degradaci bazální membrány dochází především prostřednictvím matrix-metaloproteináz (MMP), ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) proteáz a katepsinů vylučovaných EC (Hiraoka, 1998; Trochon et al., 1998; Cavallo-Medved et al., 2009). Zároveň s degradací membrány dochází k dalšímu uvolňování proangiogenních růstových faktorů vázaných v extracelulárním matrix (ECM) jako například VEGF nebo transformujícího růstového faktoru  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Lee et al., 2005; Yu & Stamenkovic, 2000). Proteázy nehrají roli pouze v uvolňování proangiogenních faktorů, ale štěpením ECM také produkují endogenní inhibitory angiogeneze jako například angiostatin (Moses & O'Reilly, 2003), čímž se celý proces angiogeneze citlivě zpětnovazebně reguluje.

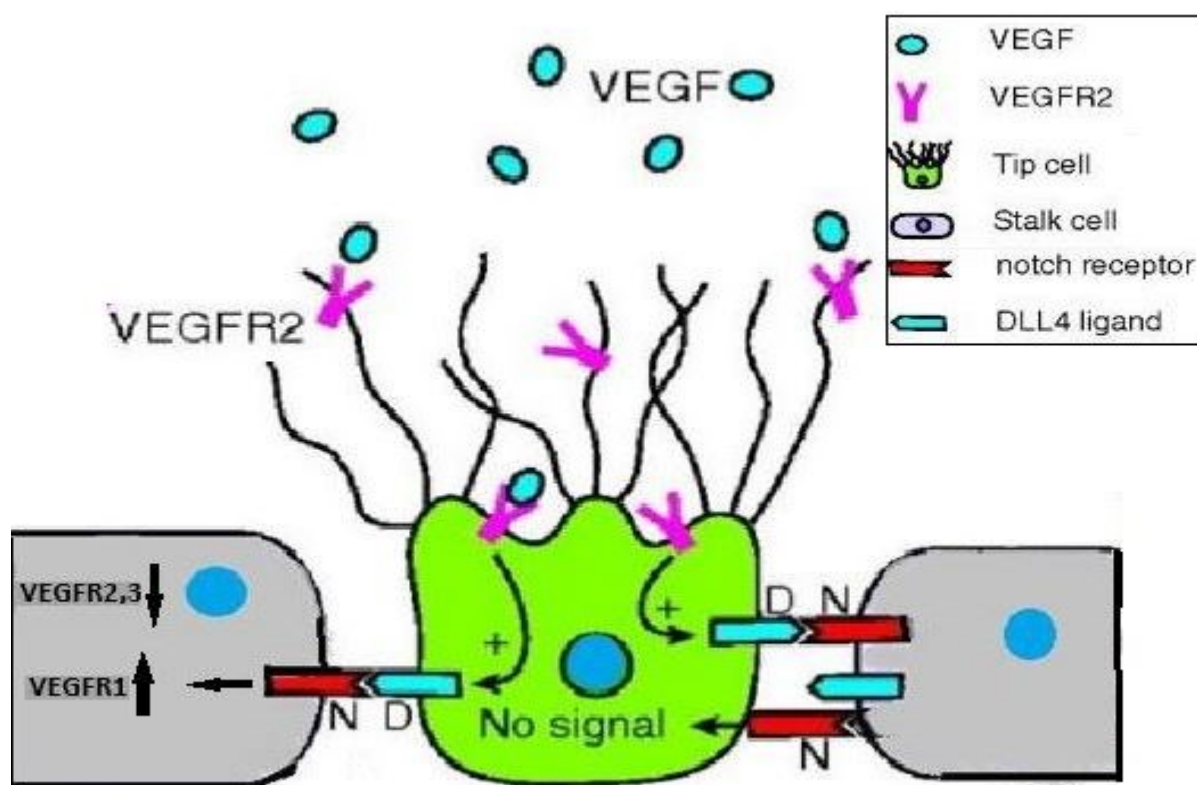
#### **3.2.1.2 Změna endoteliálního fenotypu**

Dalším krokem angiogeneze je změna endoteliálního fenotypu, kdy dochází k „vyprofilování“ endotelových buněk na buňku vrcholovou (tzv. tip cell) a buňky následující (stalk cells). Tímto způsobem dochází k vytváření takzvaného cévního pupenu.

Prvotním krokem tvorby cévního pupenu je právě změna fenotypu endotelií. Vyprofilování buněk na vrcholové nebo následující je řízeno Notch signální dráhou.

Zvýšená exprese Notch1 receptorů na buňkách následujících a zvýšená exprese delta-4 (DLL4) který je ligandem Notch1, u buněk vrcholových ukazuje, že Notch1 signalizace inhibuje proměnu buňky následující ve vrcholovou (Hellstrom et al., 2007).

Na diferenciaci endotelie na buňku vrcholovou nebo následující se dále podílí také VEGF, který je spolu s Notch1 zapojen do zpětnovazebné smyčky (Obr.1). VEGF/VEGFR-2 stimuluje ve vrcholových buňkách expresi DLL4 (Liu et al., 2003). DLL4 inhibuje svou vazbou na Notch1 v buňkách následujících přechod k fenotypu buňky vrcholové snížením exprese VEGFR-2, VEGFR-3 a naopak zvýší expresi VEGFR-1, vázající VEGF s vysokou afinitou, ale vyvolávající slabou buněčnou odezvu (Jakobsson et al., 2010). O tom z jaké buňky se stane vrcholová, rozhodují právě tyto faktory, ale roli hraje také to, jaká buňka bude ve větší míře exprimovat VEGFR-2 nebo jak rychle bude vytvářet DLL4.



Obrázek 1: Zpětnovazebná smyčka VEGF-Notch1 vede k selekci vrcholového a následujícího fenotypu endotelových buněk. Převzato a upraveno z Geudens et al., 2011.

### 3.2.1.3 Migrace a proliferace endotelových buněk

Prodávající se pupen je směřován vrcholovou buňkou do míst se zvyšujícími se nároky na cévní zásobení. Na povrchu vrcholové buňky jsou filopodia, dlouhé tenké výběžky napomáhající migraci EC (shrnutí v Adams & Eichmann, 2010).

Díky vysoké koncentraci VEGFR-2 receptorů jsou tak tyto směřovány do míst s vysokou koncentrací VEGF (Gerhardt et al., 2003).

Vrcholová buňka tedy určuje směr vývoje a růstu pupenu, ale hlavními proliferačními elementy jsou buňky následující. Díky nim dochází k vlastnímu prodlužování pupenů, kdy je vrcholová buňka vlastně tlačena vpřed masou proliferujících následujících buněk (Qutub & Popel, 2009).

#### **3.2.1.4 Tubulogeneze**

Tubulogeneze neboli vznik lumen cév je dalším krokem v procesu angiogeneze. Proces formování lumen cév je nesmírně efektivní, umožňuje endoteliím okamžité vyrovnání se s fyzikálními silami jako jsou krevní tlak nebo proud krve.

Lubarsky a Krasnow popsali pět potencionálních mechanismů, které vedou k vzniku lumen cév během morfogenetických procesů (shrnutí v Lubarsky & Krasnow, 2003). Experimentální prací bylo zjištěno, že tři z těchto mechanismů se uplatňují v angiogenezi člověka. Jedná se o rašení, rozevírání spojů mezi endoteliálními buňkami a tvorba intracelulárních otvorů a jejich postupné spojování (shrnutí v Adams & Alitalo, 2007).

Prvotní otevření lumen může být způsobeno apiko-bazální polaritou membrán přiléhajících buněk. Na apikální (strana budoucího lumen) straně se začínou vyskytovat záporně nabitě glykoproteiny, které se navzájem odpuzují a tím se dojde k vytvoření lumen cév (Ferrari et al., 2008).

Důležitou molekulou v tubulogenezi se ukazuje vaskulo-endoteliální cadherin (VE-kadherin) a Neurální kadherin (N-kadherin). N-kadherin indukuje zvýšení množství VE-kadherinu v mezibuněčných kontaktech EC (Luo & Radice, 2005). VE-kadherin je poté důležitý pro polarizaci membrán při vzniku lumen cév *in vitro* i *in vivo* (Lampugnani et al., 2010).

#### **3.2.1.5 Rekrutování pericytů a stabilizace cév**

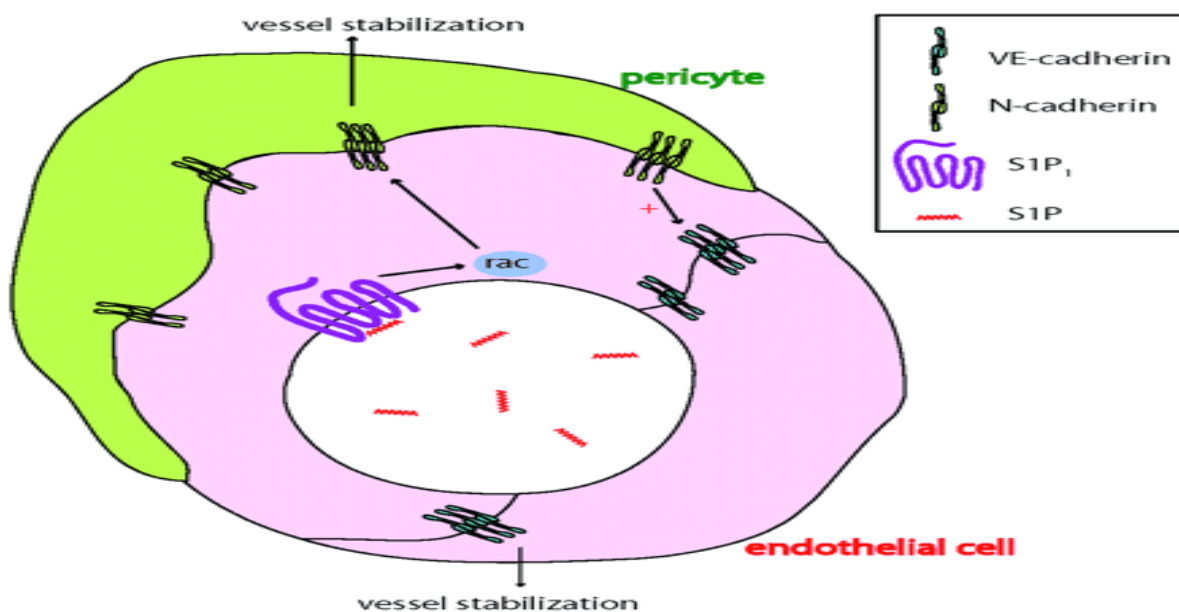
Aby nové cévy mohly plnit svou úlohu, musí dojít k jejich dozrání a stabilizaci jak v rámci EC tak i celého systému. Na systémové úrovni dozrání zahrnuje remodelaci do hierarchicky se větvícího systému a adaptaci na potřeby vyživované tkáně. Na úrovni EC dochází k rekrutování murálních buněk a tvorbě extracelulární matrix (shrnutí v Jain, 2003).

Murální buňky jsou dvojího typu. Prvním typem jsou pericyty, buňky vyskytující se na povrchu mikrovaskulárních cév a sdílející endoteliální bazální membránu (shrnutí v Allt & Lawrenson, 2001). Druhým jsou vaskulární buňky hladkého svalstva, které obklopují velké arterie a žíly. Na rozdíl od pericytů nepřiléhají přímo na bazální membránu endotelií, ale jsou od nich odděleny vrstvou ECM (Junqueira et al., 1997).

Rekrutování pericytů je řízeno několika faktory. Zásadní význam mezi těmito faktory má růstový faktor krevních destiček (PDGF) a jeho receptory. EC produkují PDGF $\beta$  zatímco pericyty exprimují PDGFR- $\beta$ , což poukazuje na parakriní interakce mezi těmito dvěma typy buněk. PDGF- $\beta$  podněcuje v pericytech proliferaci a migratorní fenotyp a pericyty jsou tímto faktorem atrahovány (shrnutí v Ribatti et al., 2011). Další molekulou s vlivem na rekrutování pericytů je VEGF, nepřímým působením skrz indukování tvorby oxidu dusnatého endoteliemi, který stimuluje migraci a proliferaci pericytů (Kashiwagi et al., 2005).

Po rekrutování pericytů dochází díky interakcím mezi nimi a EC ke stabilizaci cév. Angiopoetiny-1, 2 a jejich receptor Tie2 hrají v této stabilizaci významnou roli. Zatímco angiopoetin-1 (ANG-1), produkovaný pericyty, po navázání na receptor Tie2 na endoteliích vede ke stabilizaci cév, udržení pericytů v kontaktu s endoteliemi (Sundberg, 2002), tak VEGF indukovaná exprese ANG-2 má za následek odpoutání pericytů od endotelií (Maisonpierre et al., 1997).

Další molekulou s rolí ve stabilizaci novotvořených cév je sfingozin-1-fosfátový receptor (S1PR) (Obr. 2). Po navázání ligandu S1P na S1PR dochází ke změně adhezivních vlastností pericytů, což negativně ovlivňuje jejich migrační a proliferační vlastnosti (shrnutí Lucke & Levkau, 2010). S1PR a jeho ligand regulují transport N-kadherinu na buněčnou membránu a tím zpevňují kontakt mezi EC a pericyty (Paik et al., 2004). N-kadherin také indukuje expresi VE-kadherinu který upevňuje buněčné spoje mezi endoteliemi (Luo & Radice, 2005).

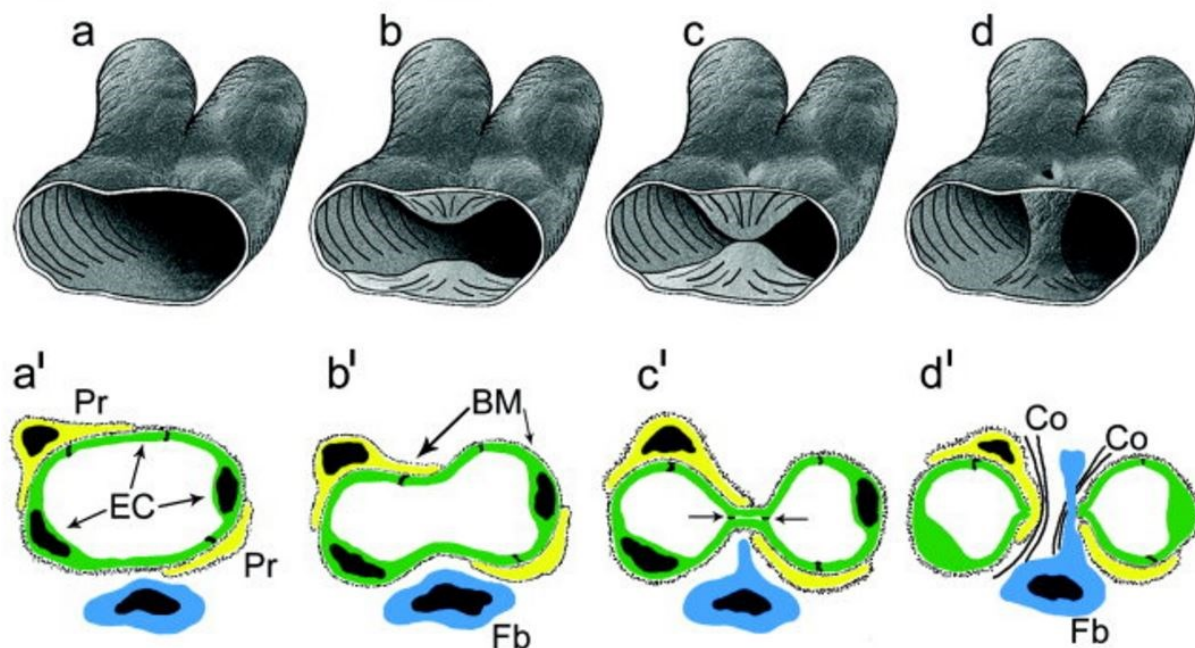


Obrázek 2: Mechanismus stabilizace cév účinkem S1PR a jeho ligandu S1P. Vazba ligandu na receptor indukuje tvorbu N-cadherinu, který stabilizuje vazbu pericyt-endotelie a zároveň indukuje tvorbu VE-cadherinu stabilizujícího spoje mezi EC. Převzato z Armulik et al. 2005.

### 3.2.2 Angiogeneze intususcepce

Pod pojmem angiogeneze Intususcepce se rozumí proces, při kterém dochází k tvorbě nových cév nebo remodelaci stávajícího cévního systému jejich rozdělováním. Koncept intususceptivní angiogeneze byl poprvé popsán Caduffem a kolegy, kdy za použití elektronového mikroskopu pozorovali otvory vzniklé ve vyvíjejících se plicních cévách (Caduff et al., 1986).

Základním krokem mechanismu angiogeneze intususcepce je vytvoření intraluminálního pilíře (Obr. 3), který je tvořen buňkami stěny kapiláry invagovanými do lumen cévy. Tvorba pilíře zahrnuje několik kroků. Nejdříve dochází k migraci endotelových buněk z cévních stěn směrem dovnitř lumen cévy. Poté se buňky spojují za vzniku primárního intraluminálního pilíře. Následně dochází k přeorganizování těsných spojů a vzniká volný prostor v jádru pilíře. Tam invadující pericyty a fibroblasty rozšiřují vnitřek pilíře a vystylají ho kolagenovými fibrilami. K samotnému rozdělení cévy na dvě nové dochází spojením více pilířů dohromady (Shrnuto v Burri et al., 2004).



Obrázek 3: Trojrozměrné (a-d) a dvojrozměrné (a'-d') znázornění vzniku intraluminálního pilíře. Proces začíná přibližováním invaginovaných endotelií (EC) směrem k sobě resp. do cévního lumen (a,b,a',b'). Po spojení migrujících endotelií (c, c') dochází k perforaci vzniklé endotelové dvojvrstvy a bazální membrány (BM) a rozšiřování obvodu pilíře fibroblasty (Fb) a pericyty (Pr). Tyto buňky také vystylají vzniklý prostor kolagenovými fibrilami (Co). Převzato z Burri et al., 2004.

Jaké molekuly ovlivňují IA, zůstává stále nejasné. Nadměrná exprese FGF-2 při IA naznačuje, že tento faktor je jedním z možných hráčů v tomto procesu (Makanya et al., 2007).

Dále bylo pozorováno, že po snížení exprese VEGF dochází k indukci angiogeneze intususcepce (Hlushchuk et al., 2011).

## **4 Angiogenní faktory**

V roce 1996 definoval Risau tři vlastnosti, které by látka měla splňovat, aby mohla být nazývána angiogenním faktorem. (i) měla by se vyskytovat v průběhu angiogeneze a nevyskytovat za normálních fyziologických podmínek, když angiogeneze neprobíhá. (ii) měla by difundovat k endoteliím a na nich s vysokou specifiitou aktivovat receptor nebo určitý gen. Výsledkem nadměrné exprese této látky by měl být vznik více nových cév. (iii) neutralizování aktivity dané látky nebo jejího receptoru či genu povede k inhibici nebo prevenci vzniku angiogeneze (Risau, 1996). Stejně angiogenní faktory ovlivňují fyziologickou i patologickou neovaskularizaci a právě ony nebo jejich receptory jsou jedním z možných cílů antiangiogenních terapií.

### **4.1 Vaskulární endoteliální růstový faktor**

Faktor, o kterém je zatím nashromážděno nejvíce informací, je vaskulární endotelový růstový faktor VEGF. VEGF je 34- 45 kDa dimerní glykosidovaný protein, u člověka existující v 5 izoformách: VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189, VEGF206. Tyto izoformy vznikají alternativním sestřihem mRNA, kdy dvě nejkratší izoformy jsou secernovány ven z buňky, zatímco ostatní zůstávají asociovány s produkující buňkou (Houck et al., 1992; Poltorak et al., 1997).

VEGF působí skrz interakci s vysoko-afinitními tyrozin kinázovými receptory Flt1 (VEGFR-1) a Flk-1/KDR (VEGFR-2) nalézajících se téměř výlučně na endotelových buňkách (Seetharam et al., 1995; Millauer et al., 1993).

Od popsání VEGF bylo objeveno mnoho účinků této molekuly na angiogenezi, ať již za podmínek fyziologických nebo patologických, VEGF bylo identifikován jako mitogen a chemoatraktant pro EC (Leung et al., 1989), ovlivňuje tvorbu proteáz např. kolagenázy endoteliemi (Unemori et al., 1992), podílí se na mobilizaci endoteliálních prekursorů (Hattori et al., 2001) a také slouží jako faktor podporující přežití endotelií (Alon et al., 1995). VEGF také zvyšuje permeabilitu hematoencefalické bariéry (Jiang et al., 2014).

### **4.2 Fibroblastový růstový faktor**

Dalšími důležitými faktory je rodina FGF, která zahrnuje 22 genů, kódujících proteiny (shrnuté v Itoh & Ornitz, 2004). Nejlépe charakterizovanými proteiny jsou FGF-1 a FGF-2. FGF-2 existuje v několika izoformách, kdy pět z nich vzniká mechanismem alternativního



počátku translace. Nízko molekulární forma FGF-2 je secernována dráhou Endoplazmatické retikulum/Golgiho aparát buňkou ven zatímco vysokomolekulární formy zůstávají v cytosolu nebo jádře secernující buňky (Shrnuto v Sorensen et al., 2006). FGF se váže na endotelie skrz své tyrosin kinázové receptory FGFR 1-4.

FGF-1 i 2 ovlivňuje angiogenezi několika způsoby. Je chemoatraktantem endotelií (Kanda et al., 2009), podporuje invazivní charakter endotelií indukci vzniku proteolytických enzymů (shrnutí v Basilico & Moscatelli, 1992) a vykazuje synergistický efekt s hepatocytárním růstovým faktorem a VEGF (Schmidt et al., 1999).

#### **4.3 Růstový faktor krevních destiček**

Proteiny z rodiny růstových faktorů krevních destiček PDGF-A a PDGF-B s homologní strukturou s VEGF jsou dimery vázající se na tyrosin kinázové receptory PDGFR- $\alpha$  a PDGFR- $\beta$  (shrnutí v Dunn et al., 2000).

PDGF se ukázal jako chemotatraktant pro mikrovaskulární buňky izolované z krysího mozku (Brockmann et al. 2003) a zrovna tak je zásadním faktorem pro rekrutování pericytů (shrnutí v Ribatti et al., 2011).

#### **4.4 Transformující růstový faktor $\beta$**

V lidském těle se vyskytující TGF- $\beta$  izoformy TGF- $\beta$  1, 2, a 3 signalizují skrz serin/threonin kinázové receptory TGF $\beta$ R 1 a TGF $\beta$ R2 (shrnutí v Massague & Lo, 2000). TGF proteiny také vážou pomocné receptory například betaglykan a endoglin, které jsou ko-exprimovány mikrovaskulárními endoteliemi (Wong et al., 2000).

V dostupné literatuře byly popsány protichůdné efekty TGF-  $\beta$ : *in vivo* byl popsán jako faktor stimulující angiogenezi, za použití angiogenního diskového systému a *in vitro* indukoval formaci tubulů (Fajardo et al., 1996; Krishnan et al., 2015); nicméně bylo pozorováno TGF-  $\beta$  indukované snížení exprese VEGF skrz post-transkripční úpravy a tím inhibie angiogeneze v nádorových buňkách karcinomu tlustého střeva (Geng et al., 2013).

#### **4.5 Hepatocytární růstový faktor**

Hepatocytární růstový faktor (HGF) je heterodimer složený z  $\alpha$  (69kDa) a  $\beta$  podjednotky (34kDa) (Nakamura & Mizuno, 2010). Jako HGF receptor byl identifikován c-Met. Nadměrná exprese HGF stimuluje nádorovou angiogenezi a růst nádoru. inhibicí exprese receptoru pro HGF lze docílit suprese nádorového růstu inhibicí angiogeneze a spuštěním apoptózy (Abounader et al., 2002).

## 4.6 Další angiogenní faktory

V neovaskularizaci hraje roli množství dalších faktorů které ji ovlivňují. Mezi takové faktory patří **angiopoetin 1 a 2**, které hrají klíčovou roli v stabilizaci vznikajících cév. ANG-1 i ANG-2 se váží na svůj tyrosin kinázový receptor Tie2 a ovlivňují stabilitu interakcí mezi pericyty a endoteliemi (Sundberg,2002; . Nadměrná exprese ANG-2 vede k destabilizaci cév, ale v přítomnosti VEGF dochází zároveň k iniciaci angiogeneze pučením a tím rozšiřování cévní sítě. Pokud jsou, ale buňky vystavené nadměrnému vlivu ANG-2 bez podpůrného účinku VEGF, spouští ANG-2 apoptózu a regresí cév (Maisonpierre et al., 1997).

**Tumor nekrotizující faktor  $\alpha$**  (TNF $\alpha$ ) je makrofágy tvořený cytokin s pleiotropním účinkem (shrnutí v Locksley et al., 2001). Role TNF $\alpha$  v angiogenezi je nepřímá. V jeho přítomnosti dochází k tvorbě jiných proangiogenních faktorů, například k nadměrné expresi VEGF gliomovými buňkami (Ryuto et al., 1996). TNF $\alpha$  má také vliv na změnu endoteliálního fenotypu indukci vzniku vrcholové buňky. Jeho vlivem dochází k tvorbě jagged-1, ligandu pro Notch1, což vede k potlačení vrcholového fenotypu v buňkách následujících (Sainson et al., 2008).

## 5 Mechanizmy neovaskularizace v glioblastomech

Jakmile dosáhnou pevné nádory velikosti přesahující 3mm, není již možné, aby byly všechny jejich buňky vyživovány prostou difuzí a proto nádory pro svůj další růst potřebují vznik nových cév, které tyto potřeby zastanou (Folkman et al., 1971).

Jednou z charakteristik glioblastomů je nadměrný a aberantní cévní systém, který nádor obklopuje a prostupuje jím. Na vytvoření aberantní vaskulární sítě se podílí několik mechanismů. Mezi tyto mechanismy patří: vaskulární koopce, angiogeneze pučením, vaskulogeneze, vaskulární mimikry a glioblastom-endotelová transdiferenciace. Všechny těchto pět procesů napomáhá progresi nádorů a tím zhoršují perspektivy pacientů trpících tímto onemocněním.

### 5.1 Vaskulární koopce

Vaskulární koopce je prvním mechanismem vaskularizace glioblastomu. Proces zahrnuje organizaci nádorových buněk do útvarů obalujících původní mozkové mikrocévy. a tím jaké si „využít“ původního cévního systému pro potřeby nádoru. Poprvé byl popsán na zvířecích modelech a zároveň bylo zjištěno, že se jedná o jeden z prvních kroků jak se aberantní síť cév GBM začíná formovat (Holash et al., 1999).

Kooptující buňky iniciují apoptózu EC, vyústující v hypoxii a acidózu a tím dochází k iniciaci angiogeneze. Zvýšená exprese ANG-2 endoteliemi kooptovaných cév, navíc vede k destabilizaci dalších kapilár. Tyto procesy byly pozorovány na myších modelech, kterým byly implantovány gliomové buňky. V prvním týdnu po implataci do myších mozků byly za pomoci elektronového mikroskopu objeveny útvary nádorových buněk kolem vlastních cév mozku a nebyly pozorovány žádné nově vzniklé cévy. V třetím týdnu pokusu se objevily první EC zničené apoptózou, která vyústila v regresi cév a způsobila nekrózu nádoru. Vzniklá hypoxie vedla k spuštění angiogeneze (Zagzag et al., 2000).

Jako možnou látku s chemotaktickou aktivitou na migraci gliomových buněk směrem k cévám, které budou kooptovány, se ukázal bradykinin. Pozorovaná exprese bradykininového receptoru na gliomových buňkách, s nejvyšší expresí v perivaskulárních oblastech naznačuje roli bradykininu jako chemoatraktantu gliomových buněk. Za použití *in vitro* migračních experimentů byl tento vliv bradykininu na gliomové buňky potvrzen (Montana & Sontheimer, 2011).

## **5.2 Angiogeneze pučením asociovaná s GBM**

Jak bylo popsáno výše, vaskulární koopce je iniciačním procesem vedoucím k spuštění angiogeneze v GBM. Angiogeneze jako stěžejní a významný proces v neovaskularizaci GBM byla poprvé popsána Bremem a kolektivem v roce 1976 (Brem et al., 1976). Výsledkem je charakteristicky abnormální vaskulární systém s rozšířenými klikatými cévami a nezvyklé větvení sítě.

Novotvorba cév angiogenzí u glioblastomů probíhá přes mechanismus hypoxií indukované angiogeneze pučením, která se příliš neliší od fyziologické, vyskytují se v ní však v různé míře nadměrně exprimované angiogenní faktory.

Faktorem neovaskularizace glioblastomu je také chemokinový receptor CXCR4 vyskytující se na endoteliích a jeho ligand CXCL-12 (Zagzag et al., 2006).

Experimentální práce ukazují na významnou roli gliomových kmenových buněk (GSC) v podpoře angiogenních procesů prostřednictvím tvorby VEGF a CXCL-12. Nádory s vysokým obsahem GSC jsou vysoce angiogenní, jelikož GSC v hypoxických podmínkách prolifерují, zvětšují objem nádoru a tím i expresi VEGF (Folkens et al., 2009).

I přesto, že bylo dokázáno, že hypoxie hraje esenciální roli v iniciaci angiogeneze, existují také práce uvádějící výskyt mechanismů vzniku nezávislých na hypoxii. Byl pozorován potencionální nepřímý vliv TGF- $\beta$  ve vazbě s jeho receptory na zvýšení mRNA VEGF a placentačního růstového faktoru a uvolňování těchto proteinů do okolí (Krishnan et al., 2015).

### 5.3 Vaskulogeneze asociovaná s GBM

Třetím mechanizmem glioblastomové neovaskularizace je vaskulogeneze asociovaná s nádorem. Vaskulogeneze je děj, kdy jsou v nově vzniklých cévách přítomny diferenciované endoteliálními progenitory (EPC) původem z kostní dřeně cirkulující v krevním oběhu. Počet mobilizovaných EPC v krevním řečišti je u pacientu s glioblastomem vyšší než je normální hladina a jejich počet koreluje s úrovní nádorové neovaskularizace (Rafat et al., 2010).

V rámci vaskulogeneze glioblastomu se uplatňuje ještě další buněčný typy. Jedná se o makrofágy asociované s nádory (TAM) (Pollard, 2004), včetně populace TIE-2 exprimujících monocytů (TEM) (De Palma et al., 2005). TEM cirkulující krevním řečištěm cílí do míst patologické neovaskularizace, kde se poté vyskytují v blízkosti cév (Murdoch et al., 2007).

Jako zásadním pro rekrutování EPC a TAM se ukazuje být CXCL12/CXCR4 signální mechanismus (Aghi et al., 2006). EPC a TAM exprimují CXCR4 a migrují ve směru gradientu CXCL12 který je vylučován nádorovými buňkami. (Aghi et al., 2006). Dalším faktorem ovlivňujícím rekrutování buněk kostní dřeně je i HIF-1. HIF-1 indukuje expresi CXCL12 a tím nepřímo podporuje rekrutování EPC a TAM (Du et al., 2008). TEM jsou na rozdíl od tohoto mechanismu atrahovány angiotensinem-2 vylučovaným aktivovanými buňkami v cévních stěnách (Murdoch et al., 2007).

Další možná role vaskulogeneze byla demonstrována ve vztahu k nádorům vystaveným radioterapii. V myších modelech, následně po ozáření nádoru docházelo k velké rekrutaci EPC do tkáně glioblastomu, kde napomáhali rychlejší a efektivnější opravě poškozeného vaskulárního systému ozářené tkáně. Inhibicí HIF-1 nebo CXCL12/CXCR4, došlo k potlačení nádorové recidivy. Stalo se tak díky inhibici signálních cest vedoucích k rekrutování buněk kostní dřeně (Kioi et al., 2010).

### 5.4 Vaskulární mimikry

Vaskulární mimikry jako jeden ze způsobů neovaskularizace nádorů byl popsán v roce 1999 na maligních melanomech (Maniotis et al., 1999). Jde o proces, ve kterém se vytváří krevní kanály nezávislé na endotelových buňkách a jejichž povrch je tvořen nádorovými buňkami na místo endotelií. Cévy takto vytvořené jsou napojeny na stávající krevní řečiště. V následujících letech byl dokázán výskyt vaskulárních mimikry i u dalších typů nádorů včetně výskytu v tkáni lidského glioblastomu (Yue et al., 2005; Hallani et al., 2010) toto zjištění bylo později také potvrzeno na xenograftu lidské gliomové buněčné linie (Nicolou et al., 2008).

Do dnešní doby není mechanismus vzniku vaskulárních mimikr plně objasněn. Jsou však známy některé faktory, které hrají roli v jejich úspěšném průběhu. Mezi tyto faktory patří

přítomnost gliomových kmenových buněk a růstové faktory s jejich ligandy. V GBM byl pozorován výskyt vaskulárních kanálů tvořených  $\alpha$ -aktinem hladkého svalu ( $\alpha$ SMA) nebo PDGFR pozitivními buňkami tedy markery mesenchymálních buněk. Zároveň se pomocí fluorescenční in situ hybridizační sondy (FISH) specifické pro gen receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR), který je charakteristický pro maligní gliomové elementy v některých GBM (Heimberger et al., 2005; Feng et al., 2012), potvrdilo, že část buněk tvořící vaskulární kanály je EGFR pozitivní. To svědčí pro jejich maligní původ v gliálních buňkách. Tato skutečnost byla potvrzena *in vitro* experimenty s GSC. Médiem indukovaná diferenciací GSC vedla ke vzniku buněk s markery charakteristickými pro gliální (např. GFAP) tak mesenchymální (např.  $\alpha$ SMA) buňky. Navíc takto diferencované populace buněk pocházející z GSC jsou schopny v in vitro podmínkách vytvářet primitivní cévní síť na rozdíl od samotných nediferencovaných GSC (Scully et al., 2012).

Dalším faktorem ukazujícím se důležitým pro průběh vaskulárních mimiker je přítomnost VEGFR-2, jehož zvýšená exprese byla na GCS opakovaně prokázána (Yao et al., 2013; Scully et al., 2012). Pokud dojde k aktivaci receptoru ligandem VEGF dochází k buněčné proliferaci (Xu et al., 2013) a tvorbě tubulárních struktur (Francescone et al., 2012).

Dalšími molekulami s potencionální rolí na vaskulární mimezi jsou TGF- $\beta$  (Ling et al., 2011) nebo microRNA-9, který se ukázal jako inhibitor vzniku vaskulárních mimiker. Inhibice vaskulární mimeze pomocí microRNA-9 působí skrz omezení exprese proteinu stathmin 1, který je ve své fosforylované formě důležitý pro stabilizaci vznikajících mikrotubulárních struktur při mitoze (Song et al., 2013).

Podobně jako v případě vaskulogenze byl i u vaskulární mimeze dokázán vliv na zvýšenou radioresistenci nádoru. Za použití 3D modelu byla pozorována tvorba mozaikových cév vzniklých inkorporací gliomových buněk mezi endotelie cév. Takovéto cévy vykazovaly poté větší radiorezistenci, než cévy tvořené pouze EC (Shaifer et al., 2010).

## 5.5 Glioblastom-endotelová transdiferenciace

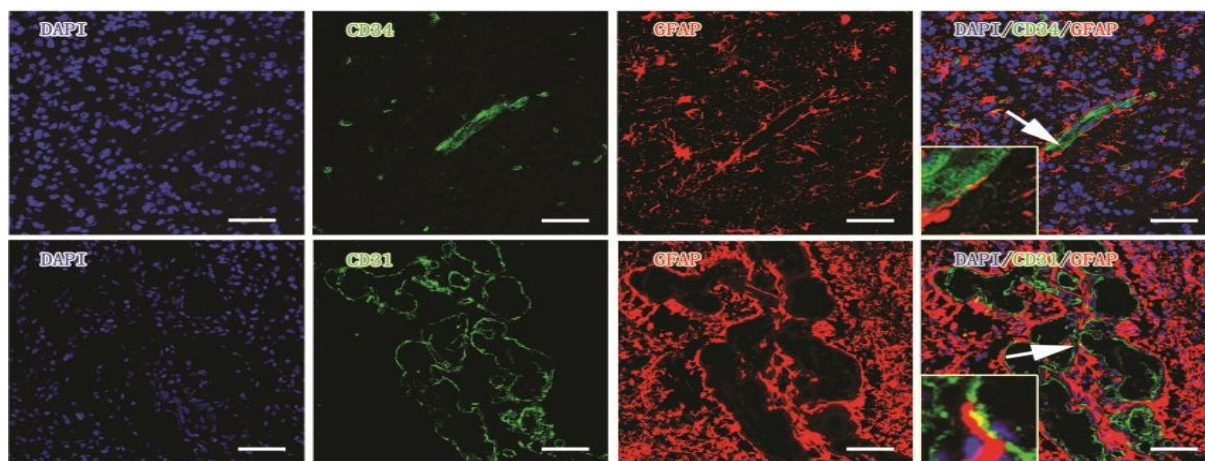
Novým, nedávno popsaným mechanismem neovaskularizace glioblastomu je glioblastom-endotelová transdiferenciace. Základním předpokladem je schopnost gliomových kmenových buněk diferencovat v buňky endotelové se schopností tvořit vaskulární kanály nezávisle na hostitelských endoteliích. Přesný popis těchto dějů a jejich mechanismů ale zatím chybí.

Tento proces byl poprvé popsán na melanomech (Pisacane et al., 2007), posléze byl pozorován i v tkáních lidských GBM. Užitím FISH barvení byly pozorovány EC nesoucí

genetické aberace typické pro buňky glioblastomu. V *in vitro* experimentech se poté ukázalo, že mezi GSC jsou subpopulace koexprimující VE-cadherin, a CD133 tedy marker GSC a že tyto buněčné subpopulace jsou schopny diferencovat na EC (Wang et al., 2010).

Ve stejném roce druhá výzkumná skupina také ukázala kapacitu GSC diferencovat v EC tentokrát však v *in vivo* experimentu (Ricci-Vitiani et al., 2010).

Bylo také prokázáno, že na rozdíl od EPC v krevním řečišti, vykazují EPC vyskytující se v glioblastomové tkáni genetické aberace gliomových buněk, naznačující GSC transdiferenciaci na EPC (Zheng et al., 2013). Zatím poslední pozorováním tohoto jevu je díky metodě zobrazování živých buněk, demonstrování výskytu buněk podobných EC transdiferenciovaným z GSC a tvořících cévní stěnu. V těchto buňkách byla dvojitým barvením analyzována koexprese gliálních a endotelových markerů (Obr. 4) (Mei et al., 2017).



Obrázek 4: Imunohistochemické barvení glioblastomové tkáně odhalilo v cévách koexpresi endotelálních faktorů CD31, 34 spolu s GFAP který je markerem gliálních buněk, ukazující tím vznik buněk podobných EC z GSC. Převzato z Mei et al., 2017.

Molekulární mechanismy průběhu transdiferenciace jsou prakticky neznámé. Jedním z možných molekulárních kandidátů se jeví transkripční faktor LMO2, který je důležitým faktorem diferenciací hematopoetické a endotelové linie (Koyano-Nakagawa et al., 2012). Byla pozorována indukce exprese VE-cadherinu v GSC faktorem LMO2, a tím iniciovaná změna GSC fenotypu směrem k endotelálnímu (Kim et al., 2015).

Fenomén glioblastom-endotelální diferenciací stále zůstává tématem obklopeným otázkami. S přibývajícím výzkumy zabývajícím se tímto jevem, se může v brzké budoucnosti glioblastom-endotelální transdiferenciace ukázat jako vhodný kandidát pro vývoj úspěšné terapie v boji s glioblastomem.

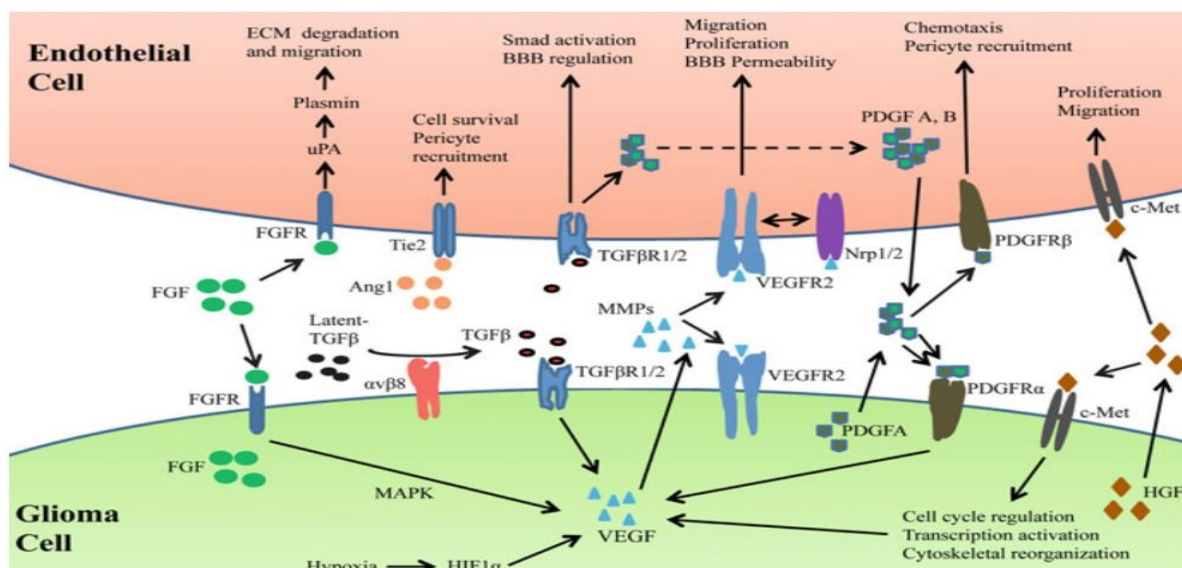
## 5.6 Angiogenní faktory v glioblastomu

Stejně jako v neovaskularizaci za fyziologických podmínek tak i při novotvorbě cév v glioblastomu jsou nezbytnou součástí procesu angiogenní faktory. V obou formách neovaskularizace, nepatologické i patologické, hrají roli stejné faktory. Zásadním rozdílem však je, že angiogenní faktory v glioblastomu jsou oproti fyziologickému stavu většinou nadměrně exprimovány, na nesprávném místě. Typickým příkladem je VEGF.

**VEGF** je zvýšeně exprimován jak gliomovými buňkami (Plate et al., 1993), tak i buňkami kmenovými, GSC (Wang et al., 2016). Dále byl dokázán vliv VEGF na proliferaci právě GSC, kdy proliferační účinek je indukován vazbou VEGF na VEGFR-2 exprimovaným na GSC (Xu et al., 2013). V glioblastomech byly detekovány 3 izoformy VEGF: VEGF121, VEGF165, a VEGF189, ne však VEGF206 (Machein et al., 1999). Různé formy VEGF mohou mít neovaskularizaci GBM různou úlohu. Při implantaci gliomových buněk U87 do myši, byl pozorován vznik hemoragií při nadměrné expresi VEGF121 a VEGF165, ne však při expresi VEGF189 (Cheng et al., 1997).

I další angiogenní faktory jsou glioblastomem nadměrně exprimovány. Nadměrná exprese **FGF-1 i 2** v gliomovými buňkami byla prokázána (Stefanik et al., 1991). FGF-2 také stimuluje expresi VEGF gliomovými buňkami *in vitro* (Tsai et al., 1995). In situ hybridizací byla potvrzena vyšší exprese **PDGF-B** v glioblastomové tkáni oproti zdravé mozkové tkáni (Hermansson et al., 1988). V glioblastomu byla prokázána stimulace exprese VEGF gliomovými buňkami díky **TGF-  $\beta$**  (Seystahl et al., 2015). **Hepatocytární růstový faktor** (HGF) a jeho tyrosin kinázový receptor c-Met jsou exprimovány gliomovými buňkami (Koochekpour et al., 1997). S glioblastomem asociované endotelie produkují HGF receptor c-Met na svém povrchu. To naznačuje, že jsou parakrinně stimulovány přes HGF z gliomových buněk, kdy tato stimulace vede k endoteliálnímu růstu a pučení (Ding et al., 2003).

Vztah růstových faktorů účastnících se angiogeneze a dalších neovaskularizačních mechanismů v progresi glioblastomu je velmi komplexní (Obr. 5). Reaguje vždy několik faktorů najednou a nezřídka se mezi nimi objevuje synergistický efekt. I přes tuto komplexitu zůstávají růstové faktory nebo jejich receptory, nejslibnějším cílem pro vyvinutí antiangiogenních terapií vedoucích k potlačení růstu glioblastomu.



Obrázek 5: Shrnutí faktorů účastnících se angiogeneze glioblastomu, kdy gliomové buňky ovlivňují vlastnosti EC v několika různých směrech. Stimulací proliferace, migrace a přežití EC. A v neposlední řadě také upravují vlastnosti hematoencefalické bariéry. Růstové faktory také zasahují do fyziologie gliomových buněk, například indukcí exprese VEGF. Převzato z Cheerathodi et al., 2014.

## 6 Inhibice angiogeneze jako možný terapeutický přístup u GBM

Jedním ze základních znaků glioblastomů je jejich nadměrná neovaskularizace. V souladu s faktem, že nádory jsou závislé na přísunu živin krevním zásobením se jeví zablokování neovaskularizace jako vhodný kandidát terapeutických přístupů. V současnosti je většina anti-angiogenních léčiv cílena na inhibici VEGF nebo jeho receptorů a tím zablokování signální kaskády vedoucích k proliferaci, migraci a přežití buněk (shrnutí v Popescu & Dricu, 2016). Mezi léky cílícími na VEGF/VEGFR osu patří Bevacizumab, Cediranib (blokátor tyrosin kinázové aktivity, (Drazin & Phuphanich, 2016)), Aflibercept (vysokoafinitní solubilní VEGF receptor snižující hladinu cirkulujícího VEGF (Holash et al., 2002)) a v neposlední řadě Sorafenib (inhibitor aktivity VEGFR a PDGFR (Zustovich et al., 2013)) nebo Sunitib (širokospektrý inhibitor receptorů s tyrosinkinázovou aktivitou (Hatipoglu et al., 2015)).

Lékem s nejlépe popsáním mechanismem účinku a největšími klinickými zkušenostmi je monoklonální protilátka proti VEGF Bevacizumab (Ferrara, & Novotny, 2004). Preklinické testy s Bevacizumabem provedené na glioblastomech prokázali inhibici angiogeneze a růstu nádoru (Rubenstein et al., 2000; Jahnke et al., 2009). Bohužel, v rámci recentních klinických testů se při použití samotného Bevacizumabu neukázalo signifikantní prodloužení celkového přežití, prodoužil se ale čas, kdy se po podání léčby stav pacientů nezhoršoval (Schaub et al.,



2016). Dalším problémem při použití Bevacizumabu se ukázala být zvýšená invazivita nádorových buněk a větší míra vaskulární koopce (Rubenstein et al., 2000; Auf et al., 2010).

## **7 Závěr**

Výzkumu angiogeneze se za posledních třicet let věnovaly desítky vědeckých týmů a bylo učiněno mnoho významných objevů rozvíjejících znalosti o neovaskularizaci do šíře v jaké jsou dnes. Tento rozsah znalostí je však stále plný otazníků, ať již se jedná o neovaskularizaci fyziologickou, nebo patologickou. Problémem výzkumu tohoto jevu je nesmírná komplexita procesu zahrnující několik buněčných typů a širokou síť vzájemně propojených pro a antiangiogenních faktorů. Anti-angiogenní terapie je v současné době úspěšně používána jako součást některých solidních nádorů (malobuněčný nádor plic) a na řadě jiných se zkouší.

Glioblastom se svou bohatou a aberantní vaskularizací se jevil jako nádor, kde by tento terapeutický přístup mohl vykazovat vysokou efektivitu. Nicméně studie testující terapeutický efekt anti-angiogenní terapie přinesly rozpačité výsledky ve smyslu prodloužení intervalu mezi novým vzplanutím onemocnění, nikoli však v prodloužení doby přežití. Selhání této léčebné strategie není uspokojivě vysvětleno. Bližší poznání mechanismů angiogeneze glioblastomu je proto nutnou prerekvizitou k definitivnímu rozřešení problému, zda antiangiogenní terapie u glioblastomu bude nebo nebude mít svoje stálé místo v terapeutických postupech. Bližší poznání mikroprostředí samotných glioblastomů, buněčných subpopulací a hledání molekul specifických pro GBM může pomoci najít zcela nový terapeutický přístup.

V poslední době se v literatuře hromadí data o zapojení serínové proteázy Fibroblastového aktivačního proteinu (FAP) do procesu angiogeneze. Jde o proteázu s duální, exo i endogenní enzymatickou aktivitou, schopnou participovat s matrixmetaloproteinázami na štěpení některých proteinů ECM. Tato proteáza navíc zasahuje do fibrinolytického systému a v neposlední řadě je schopna štěpit některé biologicky relevantní peptidy zapojené i do procesu angiogeneze. FAP v myších modelech zasahoval do novotvorby cév a tím ovlivňoval progresi nádoru (Huang et al., 2004). V roce 2011 Keane a kolegové popsali endogenní substrát pro FAP, jímž je molekula Neuropeptidu Y. Její forma vzniklá rozštěpením proteázou FAP reaguje se svým receptorem na endotelových buňkách a indukuje tím angiogenezi podobně jako růstové faktory (Keane et al., 2011). Hypotézu o zapojení FAP do angiogeneze glioblastomu podporuje i pozorování výskytu FAP pozitivních buněk v těsné blízkosti poškozených cév naší skupinou (Busek et al., 2016).

V pochopení neovaskularizačních procesů v glioblastomu zůstává i v dnešních dnech mnoho otázek. S každým přibývajícím výzkumem se zvyšuje šance na vyvinutí účinné léčby interferující s neovaskularizací GBM. V tomto ohledu právě molekuly jako FAP, mají vysoký potenciál na to být tím hledaným prvkem ve vyvinutí terapeutického postupu.

## 8 Použitá literatura

Abounader, R., Lal, B., Luddy, C., Koe, G., Davidson, B., Rosen, E. M., & Laterra, J. (2002). In vivo targeting of SF/HGF and c-met expression via U1snRNA/ribozymes inhibits glioma growth and angiogenesis and promotes apoptosis. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(1), 108–110.

\*Adams, R. H., & Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(6), 464–478.

\*Adams, R. H., & Eichmann, A. (2010). Axon Guidance Molecules in Vascular Patterning. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5), a001875.

Aghi, M., Cohen, K. S., Klein, R. J., Scadden, D. T., & Chiocca, E. A. (2006). Tumor Stromal-Derived Factor-1 Recruits Vascular Progenitors to Mitotic Neovasculature, where Microenvironment Influences Their Differentiated Phenotypes. *Cancer Research*, 66(18), 9054 LP-9064.

\*Allt, G., & Lawrenson, J. G. (2001). Pericytes: cell biology and pathology. *Cells, Tissues, Organs*, 169(1), 1–11.

Alon, T., Hemo, I., Itin, A., Pe'er, J., Stone, J., & Keshet, E. (1995). Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature Medicine*, 1(10), 1024–1028.

Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M., & Isner, J. M. (1999). Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circulation Research*, 85(3), 221–228.

Auf, G., Jabouille, A., Guerit, S., Pineau, R., Delugin, M., Bouchecareilh, M., Magnin, N., Favereaux, A., Maitre, M., Gaiser, T., von Deimling, A., Czabanka, M., Vajkoczy, P., Chevet, E., Bikfalvi, A., & Moenner, M. (2010). Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35), 15553–15558.

Ausprunk, D. H., & Folkman, J. (1977). Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvascular Research*, 14(1), 53–65.

\*Basilico, C., & Moscatelli, D. (1992). The FGF family of growth factors and oncogenes. *Advances in Cancer Research*, 59, 115–165.

Brem S: The role of vascular proliferation in the growth of brain tumors. *Clin Neurosurg* 1976, 23:440–453

Brockmann MA, Ulbricht U, Gruner K, Fillbrandt R, Westphal M, Lamszus K (2003) Glioblastoma and cerebral microvascular endothelial cell migration in response to tumor-associated growth factors. *Neurosurgery* 52:1391–1399, discussion 1399

Burri, P. H., Hlushchuk, R., & Djonov, V. (2004). Intussusceptive angiogenesis: Its emergence, its characteristics, and its significance. *Developmental Dynamics*, 231(3), 474–488.

Busek, P., Balaziová, E., Matrasová, I., Hilser, M., Tomas, R., Syruček, M., Zemanová, Z., Krepela, E., Belacek, J., & Sedo, A. (2016). Fibroblast activation protein alpha is expressed by transformed and stromal cells and is associated with mesenchymal features in glioblastoma. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(10), 13961–13971.

Caduff, J. H., Fischer, L. C., & Burri, P. H. (1986). Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *The Anatomical Record*, 216(2), 154–164.

\*Cao, Y. (2007, September). Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(9), 2362–2368

Cavallo-Medved, D., Rudy, D., Blum, G., Bogyo, M., Caglic, D., & Sloane, B. F. (2009). Live-cell imaging demonstrates extracellular matrix degradation in association with active cathepsin B in caveolae of endothelial cells during tube formation. *Experimental Cell Research*, 315(7), 1234–1246.

Cheerathodi, M., & McCarty, J. H. (2014). Angiogenesis in Gliomas. In A. Sedo & R. Mentlein (Eds.), *Glioma Cell Biology* (pp. 187–219).

De Palma, M., Venneri, M. A., Galli, R., Sergi, L., Politi, L. S., Sampaolesi, M., & Naldini, L. (2005). Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell*, 8(3), 211–226.

Demir, R., Yaba, A., & Huppertz, B. (2010). Vasculogenesis and angiogenesis in the endometrium during menstrual cycle and implantation. *Acta Histochemica*, 112(3), 203–214.

Ding, S., Merkulova-rainon, T., & Han, Z. C. (2003). HGF receptor up-regulation contributes to the angiogenic phenotype of human endothelial cells and promotes angiogenesis in vitro. *Blood*, 101(12), 4816–4822.

Drazin, D., Al-Khouja, L., Patel, A., Hu, J., & Phuphanich, S. (2016). Long-term Remission Over Six Years for a Patient with Recurrent Glioblastoma Treated with Cediranib/Lomustine. *Cureus*, 8(1), e460.

Du, R., Lu, K. V., Petritsch, C., Liu, P., Ganss, R., Passequé, E., Song, H., VandenBerg, S., Johnson, R. S., Werb, Z., & Bergers, G. (2008). HIF1 $\alpha$  Induces the Recruitment of Bone Marrow-Derived Vascular Modulatory Cells to Regulate Tumor Angiogenesis and Invasion. *Cancer Cell*, 13(3), 206–220.

\*Dunn, I. F., Heese, O., & Black, P. M. (2000). Growth factors in glioma angiogenesis: FGFs, PDGF, EGF, and TGFs. *Journal of Neuro-Oncology*, 50(1–2), 121–137.

\*Eble, J. A., & Niland, S. (2009). The extracellular matrix of blood vessels. *Current Pharmaceutical Design*, 15(12), 1385–1400.

El Hallani, S., Boisselier, B., Peglion, F., Rousseau, A., Colin, C., Idhah, A., ... Sanson, M. (2010). A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: Tubular vasculogenic mimicry. *Brain*, 133(4), 973–982

\*Eming, S. A., Brachvogel, B., Odorisio, T., & Koch, M. (2007). Regulation of angiogenesis: wound healing as a model. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 42(3), 115–170.

Fajardo, L. F., Prionas, S. D., Kwan, H. H., Kowalski, J., & Allison, A. C. (1996). Transforming growth factor beta1 induces angiogenesis in vivo with a threshold pattern. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 74(3), 600–608.

Feng, H., Hu, B., Jarzynka, M. J., Li, Y., Keezer, S., Johns, T. G., Tang, C. K., Hamilton, R. L., Vuori, K., Nishikawa, R., Sarkaria, J. N., Fenton, T., Cheng, T., Furnari, F. B., Cavenee, W. K., & Cheng, S.-Y. (2012). Phosphorylation of dock180 at tyrosine residue Y722 by Src family kinases mediates EGFRvIII-driven glioblastoma tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8), 3018–3023.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–E386.

Ferrara, N., Hillan, K. J., Gerber, H.-P., & Novotny, W. (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 3(5), 391–400.

Ferrari, A., Veligodskiy, A., Berge, U., Lucas, M. S., & Kroschewski, R. (2008). ROCK-mediated contractility, tight junctions and channels contribute to the conversion of a preapical patch into apical surface during isochoric lumen initiation. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 21), 3649–3663.

Folkins, C., Shaked, Y., Man, S., Tang, T., Lee, C. R., Zhu, Z., Hoffman, R. M., & Kerbel, R. S. (2009). Glioma Tumor Stem-Like Cells Promote Tumor Angiogenesis and Vasculogenesis via Vascular Endothelial Growth Factor and Stromal-Derived Factor 1. *Cancer Research*, 69(18), 7243–7251.

Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C., & Williams, G. (1971). Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *The Journal of Experimental Medicine*, 133(2), 275–88.

Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V, Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., & Semenza, G. L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and Cellular Biology*, 16(9), 4604–13.

Francescone, R., Scully, S., Bentley, B., Yan, W., Taylor, S. L., Oh, D., Moral, L., & Shao, R. (2012). Glioblastoma-derived tumor cells induce vasculogenic mimicry through Flk-1 protein activation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(29), 24821–24831.

\*Geudens, I., & Gerhardt, H. (2011). Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development (Cambridge, England)*, 138(21), 4569–4583.

Geng, L., Chaudhuri, A., Talmon, G., Wisecarver, J. L., & Wang, J. (2013). TGF-Beta Suppresses VEGFA-Mediated Angiogenesis in Colon Cancer Metastasis. *PLOS ONE*, 8(3), e59918.

Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., & Betsholtz, C. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of Cell Biology*, 161(6), 1163–1177.

Hatipoglu, G., Hock, S. W., Weiss, R., Fan, Z., Sehm, T., Ghoochani, A., Buchfelder, M., Savaskan, N. E., & Eyupoglu, I. Y. (2015). Sunitinib impedes brain tumor progression and reduces tumor-induced neurodegeneration in the microenvironment. *Cancer Science*, 106(2), 160–170.

Hattori, K., Dias, S., Heissig, B., Hackett, N. R., Lyden, D., Tatenos, M., Hicklin, D. J., Zhu, Z., Witte, L., Crystal, R. G., Moore, M. A., & Rafii, S. (2001). Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(9), 1005–1014.

Heimberger, A. B., Hlatky, R., Suki, D., Yang, D., Weinberg, J., Gilbert, M., Sawaya, R., & Aldape, K. (2005). Prognostic Effect of Epidermal Growth Factor Receptor and EGFRvIII in Glioblastoma Multiforme Patients. *Clinical Cancer Research*, 11(4), 1462 LP-1466.

Hellstrom, M., Phng, L.-K., Hofmann, J. J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., Alva, J., Nilsson, A.-K., Karlsson, L., Gaiano, N., Yoon, K., Rossant, J., Iruela-Arispe, M. L., Kalen, M., Gerhardt, H., & Betsholtz, C. (2007). Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*, 445(7129), 776–780.

Hermansson, M., Nister, M., Betsholtz, C., Heldin, C. H., Westermark, B., & Funa, K. (1988). Endothelial cell hyperplasia in human glioblastoma: coexpression of mRNA for platelet-derived growth factor (PDGF) B chain and PDGF receptor suggests autocrine growth stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(20), 7748–7752.

Hiraoka, N., Allen, E., Apel, I. J., Gyetko, M. R., & Weiss, S. J. (1998). Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell*, 95(3), 365–377.

Hlushchuk, R., Ehrbar, M., Reichmuth, P., Heinemann, N., Styp-Rekowska, B., Escher, R., Baum, O., Lienemann, P., Makanya, A., Keshet, E., & Djonov, V. (2011). Decrease in VEGF expression induces intussusceptive vascular pruning. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(12), 2836–2844.

Holash, J., Davis, S., Papadopoulos, N., Croll, S. D., Ho, L., Russell, M., Boland, P., Leidich, R., Hylton, D., Burova, E., Ioffe, E., Huang, T., Radziejewski, C., Bailey, K., Fandl, J. P., Daly, T., Wiegand, S. J., Yancopoulos, G. D., & Rudge, J. S. (2002). VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11393–8.

Holash, J., Maisonpierre, P. C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C. R., Zagzag, D., ... Wiegand, S. J. (1999). Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and VEGF. *Science*, 284(5422), 1994 LP-199

Houck, K. A., Leung, D. W., Rowland, A. M., Winer, J., & Ferrara, N. (1992). Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(36), 26031–26037.

Huang, Y., Wang, S., & Kelly, T. (2004). Seprase promotes rapid tumor growth and increased microvessel density in a mouse model of human breast cancer. *Cancer Research*, 64(8), 2712–2716.

Cheng, S. Y., Nagane, M., Huang, H. S., & Cavenue, W. K. (1997). Intracerebral tumor-associated hemorrhage caused by overexpression of the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF121 and VEGF165 but not VEGF189. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(22), 12081–12087.

\*Itoh, N., & Ornitz, D. M. (2004). Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends in Genetics : TIG*, 20(11), 563–569.

Jahnke, K., Muldoon, L. L., Varallyay, C. G., Lewin, S. J., Kraemer, D. F., & Neuwelt, E. A. (2009, April). Bevacizumab and carboplatin increase survival and asymptomatic tumor volume in a glioma model. *Neuro-Oncology*.11(2), 142-150

\*Jain, R. K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation, 9(6). 685-693

Jakobsson, L., Franco, C. A., Bentley, K., Collins, R. T., Ponsioen, B., Aspalter, I. M., Rosewell, I., Busse, M., Thurston, G., Medvinsky, A., Schulte-Merker, S., & Gerhardt, H. (2010). Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nature Cell Biology*, 12(10), 943–953.

Jiang, S., Xia, R., Jiang, Y., Wang, L., & Gao, F. (2014). Vascular endothelial growth factors enhance the permeability of the mouse blood-brain barrier. *PloS One*, 9(2), e86407.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa, José CARNEIRO a Robert O. KELLEY. *Základy histologie*. Jinočany: H & H, 1997. ISBN 80-85787-37-7.

Kanda, S., Naba, A., & Miyata, Y. (2009). Inhibition of endothelial cell chemotaxis toward FGF-2 by gefitinib associates with downregulation of Fes activity. *International Journal of Oncology*, 35(6), 1305–1312.

Kashiwagi, S., Izumi, Y., Gohongi, T., Demou, Z. N., Xu, L., Huang, P. L., Buerk, D. G., Munn, L. L., Jain, R. K., & Fukumura, D. (2005). NO mediates mural cell recruitment and vessel morphogenesis in murine melanomas and tissue-engineered blood vessels. *Journal of Clinical Investigation*, 115(7), 1816–1827.

Keane, F. M., Nadvi, N. A., Yao, T.-W., & Gorrell, M. D. (2011). Neuropeptide Y, B-type natriuretic peptide, substance P and peptide YY are novel substrates of fibroblast activation protein- $\alpha$ . *The FEBS Journal*, 278(8), 1316–1332.

Kim, S.-H., Kim, E.-J., Hitomi, M., Oh, S.-Y., Jin, X., Jeon, H.-M., Beck, S., Jin, X., Kim, J.-K., Park, C. G., Chang, S.-Y., Yin, J., Kim, T., Jeon, Y., Song, J., Lim, Y. C., Lathia, J. D., Nakano, I., & Kim, H. (2015). The LIM-only transcription factor LMO2 determines tumorigenic and angiogenic traits in glioma stem cells. *Cell Death and Differentiation*, 22(9), 1517–1525.

Kioi, M., Vogel, H., Schultz, G., Hoffman, R. M., Harsh, G. R., & Brown, J. M. (2010, March). Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(3), 694-705

Koochekpour, S., Jeffers, M., Rulong, S., Taylor, G., Klineberg, E., Hudson, E. A., Resau, J. H., & Vande Woude, G. F. (1997). Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Research*, 57(23), 5391–5398.

Koyano-Nakagawa, N., Kweon, J., Iacovino, M., Shi, X., Rasmussen, T. L., Borges, L., Zirbes, K. M., Li, T., Perlingeiro, R. C. R., Kyba, M., & Garry, D. J. (2012). Etv2 is expressed in the yolk sac hematopoietic and endothelial progenitors and regulates Lmo2 gene expression. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 30(8), 1611–1623.

Krishnan, S., Szabo, E., Burghardt, I., Frei, K., Tabatabai, G., & Weller, M. (2015). Modulation of cerebral endothelial cell function by TGF-beta in glioblastoma: VEGF-dependent angiogenesis versus endothelial mesenchymal transition. *Oncotarget*, 6(26), 22480–22495.

Lampugnani, M. G., Orsenigo, F., Rudini, N., Maddaluno, L., Bouliday, G., Chapon, F., & Dejana, E. (2010). CCM1 regulates vascular-lumen organization by inducing endothelial polarity. *Journal of Cell Science*, 123(7), 1073 LP-1080.

Lee, S., Jilani, S. M., Nikolova, G. V, Carpizo, D., & Iruela-Arispe, M. L. (2005). Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *The Journal of Cell Biology*, 169(4), 681–691.

Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V, & Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science (New York, N.Y.)*, 246(4935), 1306–1309.

Ling, G., Wang, S., Song, Z., Sun, X., Liu, Y., Jiang, X., Cai, Y., Du, M., & Ke, Y. (2011). Transforming growth factor- $\beta$  is required for vasculogenic mimicry formation in glioma cell line U251MG. *Cancer Biology & Therapy*, 12(11), 978–988.

Liu, Z.-J., Shirakawa, T., Li, Y., Soma, A., Oka, M., Dotto, G. P., Fairman, R. M., Velazquez, O. C., & Herlyn, M. (2003). Regulation of Notch1 and Dll4 by Vascular Endothelial Growth Factor in Arterial Endothelial Cells: Implications for Modulating Arteriogenesis and Angiogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 23(1), 14–25.

\*Locksley, R. M., Killeen, N., & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4), 487–501

Lombardi, G., Pambuku, A., Bellu, L., Farina, M., Puppa, A. Della, Denaro, L., & Zagonel, V. (2017). Effectiveness of antiangiogenic drugs in glioblastoma patients: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Critical Reviews in OncologyHematology*, 111, 94–102.

\*Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., Scheithauer, B. W., & Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, 114(2), 97–109.



\*Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820.

\*Lubarsky, B., & Krasnow, M. A. (2003). Tube morphogenesis: Making and shaping biological tubes. *Cell*, 112(1), 19–28.

\*Lucke, S., & Levkau, B. (2010). Endothelial Functions of Sphingosine-1-phosphate. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 26(1), 87–96.

Luo, Y., & Radice, G. L. (2005). N-cadherin acts upstream of VE-cadherin in controlling vascular morphogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 169(1), 29–34.

Machein, M. R., Kullmer, J., Fiebich, B. L., Plate, K. H., & Warnke, P. C. (1999). Vascular endothelial growth factor expression, vascular volume, and, capillary permeability in human brain tumors. *Neurosurgery*, 44(4), 731–732.

Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T. H., Papadopoulos, N., Daly, T. J., Davis, S., Sato, T. N., & Yancopoulos, G. D. (1997). Angiopoietin-2, a Natural Antagonist for Tie2 that Disrupts In vivo Angiogenesis. *Science* VO - 277, (5322), 55.

Makanya, A. N., Hlushchuk, R., Baum, O., Velinov, N., Ochs, M., & Djonov, V. (2007). Microvascular endowment in the developing chicken embryo lung. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 292(5), L1136-46.

Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E. A., Gardner, L. M. G., Pe'er, J., ... Hendrix, M. J. C. (1999). Vascular Channel Formation by Human Melanoma Cells in Vivo and in Vitro: Vasculogenic Mimicry. *The American Journal of Pathology*, 155(3), 739–752.

\*Massague, J., & Lo, R. S. (2000). TGF- $\beta$  Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders. *Cell*, 103, 295–309.

McLeod, D. S., Hasegawa, T., Baba, T., Grebe, R., Galtier d'Auriac, I., Merges, C., Edwards, M., & Luty, G. A. (2012). From Blood Islands to Blood Vessels: Morphologic Observations and Expression of Key Molecules during Hyaloid Vascular System Development. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(13), 7912–7927.

Mei, X., Chen, Y.-S., Chen, F.-R., Xi, S.-Y., & Chen, Z.-P. (2017). Glioblastoma stem cell differentiation into endothelial cells evidenced through live-cell imaging. *Neuro-Oncology*.

Millauer, B., Witzmann-Voos, S., Schnurch, H., Martinez, R., Moller, N. P., Risau, W., & Ullrich, A. (1993). High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*, 72(6), 835–846.

Montana, V., & Sontheimer, H. (2011). Bradykinin promotes the chemotactic invasion of primary brain tumors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(13), 4858–4867

Moses, M. A., & O'Reilly, M. S. (2003). Regulation of angiostatin mobilization by tumor-derived matrix metalloproteinase-2. *Methods in Molecular Medicine*, 74, 375–390.

Murdoch, C., Tazzyman, S., Webster, S., & Lewis, C. E. (2007). Expression of Tie-2 by Human Monocytes and Their Responses to Angiopoietin-2. *The Journal of Immunology*, 178(11), 7405 LP-7411.

Nakamura, T., & Mizuno, S. (2010). The discovery of Hepatocyte Growth Factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. (K. Suzuki, Ed.), *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*. 86(6), 588-610

Niclou, S. P., Danzeisen, C., Eikesdal, H. P., Wiig, H., Brons, N. H. C., Poli, A. M. F., Svendsen, A., Torsvik, A., Enger, P. Ø., Terzis, J. A., & Bjerkvig, R. (2008). A novel eGFP-expressing immunodeficient mouse model to study tumor-host interactions. *The FASEB Journal*, 22(9), 3120–3128.

Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2013). The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clinical Cancer Research*, 19(4), 764 LP-772.

Paik, J. H., Skoura, A., Chae, S. S., Cowan, A. E., Han, D. K., Proia, R. L., & Hla, T. (2004). Sphingosine-1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vascular stabilization. *Genes and Development*, 18(19), 2392–2403.

Pisacane, A. M., Picciotto, F., & Risio, M. (2007). CD31 and CD34 expression as immunohistochemical markers of endothelial transdifferentiation in human cutaneous melanoma. *Cellular Oncology : The Official Journal of the International Society for Cellular Oncology*, 29(1), 59–66.

Plate, K. H., Breier, G., Millauer, B., Ullrich, A., & Risau, W. (1993). Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Research*, 53(23), 5822–5827.

Pollard, J. W. (2004, January). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews. Cancer*.4(1), 71-78

Poltorak, Z., Cohen, T., Sivan, R., Kandelis, Y., Spira, G., Vlodavsky, I., Keshet, E., & Neufeld, G. (1997). VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(11), 7151–7158.

Poole, T. J., Finkelstein, E. B., & Cox, C. M. (2001). The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development. *Developmental Dynamics*, 220(1), 1–17.

\*Popescu, A. M., Purcaru, S. O., Alexandru, O., & Dricu, A. (2016). New perspectives in glioblastoma antiangiogenic therapy. *Contemporary Oncology (Poznan, Poland)*, 20(2), 109–18.

Qutub, A. A., & Popel, A. S. (2009). Elongation, proliferation & migration differentiate endothelial cell phenotypes and determine capillary sprouting. *BMC Systems Biology*, 3, 13.

Rafat, N., Beck, G. C., Schulte, J., Tuettenberg, J., & Vajkoczy, P. (2010). Circulating endothelial progenitor cells in malignant gliomas. *Journal of Neurosurgery*, 112(1), 43–49.

\*Ribatti, D., Nico, B., & Crivellato, E. (2011). The role of pericytes in angiogenesis. *International Journal of Developmental Biology*, 55(3), 261–268.

Ricci-Vitiani, L., Biffoni, M., De Maria, R., Pallini, R., Todaro, M., Maira, G., Stassi, G., Invernici, G., Parati, E. A., Cenci, T., & Larocca, L. M. (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*, 468(7325), 824–830.

Risau, W. (1996). What, if anything, is an angiogenic factor? *Cancer Metastasis Reviews*, 15(2), 149–151.

Rubenstein, J. L., Kim, J., Ozawa, T., Zhang, M., Westphal, M., Deen, D. F., & Shuman, M. A. (2000, July). Anti-VEGF Antibody Treatment of Glioblastoma Prolongs Survival But Results in Increased Vascular Cooption. *Neoplasia*, 2(4), 306–314

Ryuto, M., Ono, M., Izumi, H., Yoshida, S., Weich, H. A., Kohno, K., & Kuwano, M. (1996). Induction of Vascular Endothelial Growth Factor by Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  in Human Glioma Cells: POSSIBLE ROLES OF SP-1. *Journal of Biological Chemistry*, 271(45), 28220–28228.

Sainson, R. C. A., Johnston, D. A., Chu, H. C., Holderfield, M. T., Nakatsu, M. N., Crampton, S. P., ... Hughes, C. C. W. (2008). TNF primes endothelial cells for angiogenic sprouting by inducing a tip cell phenotype. *Blood*, 111(10), 4997–5007.

Scully, S., Francescone, R., Faibish, M., Bentley, B., Taylor, S. L., Oh, D., Schapiro, R., Moral, L., Yan, W., & Shao, R. (2012). Transdifferentiation of glioblastoma stem-like cells into mural cells drives vasculogenic mimicry in glioblastomas. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(37), 12950–12960.

Seetharam, L., Gotoh, N., Maru, Y., Neufeld, G., Yamaguchi, S., & Shibuya, M. (1995). A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF. *Oncogene*, 10(1), 135–147.

Seystahl, K., Tritschler, I., Szabo, E., Tabatabai, G., & Weller, M. (2015). Differential regulation of TGF-beta-induced, ALK-5-mediated VEGF release by SMAD2/3 versus SMAD1/5/8 signaling in glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 17(2), 254–265.

Shaifer, C. A., Huang, J., & Lin, P. C. (2010). Glioblastoma cells incorporate into tumor vasculature and contribute to vascular radioresistance. *International Journal of Cancer*, 127(9), 2063–2075

\*Schmidt, A., Brixius, K., & Bloch, W. (2007). Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis. *Circulation Research*, 101(2), 125–136.

Schmidt, N. O., Westphal, M., Hagel, C., Ergun, S., Stavrou, D., Rosen, E. M., & Lamszus, K. (1999). Levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor and basic fibroblast growth factor in human gliomas and their relation to angiogenesis. *International Journal of Cancer*, 84(1), 10–18.

Song, Y., Mu, L., Han, X., Li, Q., Dong, B., Li, H., & Liu, X. (2013). MicroRNA-9 inhibits vasculogenic mimicry of glioma cell lines by suppressing Stathmin expression. *Journal of Neuro-Oncology*, 115(3), 381–390.

Sorensen, V., Nilsen, T., & Wiedlocha, A. (2006). Functional diversity of FGF-2 isoforms by intracellular sorting. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 28(5), 504–514.

Stefanik, D. F., Rizkalla, L. R., Soi, A., Goldblatt, S. A., & Rizkalla, W. M. (1991). Acidic and basic fibroblast growth factors are present in glioblastoma multiforme. *Cancer Research*, 51(20), 5760–5765.

Sundberg, C., Kowanetz, M., Brown, L. F., Detmar, M., & Dvorak, H. F. (2002). Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 82(4), 387–401.

Trochon, V., Li, H., Vasse, M., Frankenre, F., Thomaidis, A., Soria, J., Lu, H., Gardner, C., & Soria, C. (1998). Endothelial metalloprotease-disintegrin protein (ADAM) is implicated in angiogenesis in vitro. *Angiogenesis*, 2(3), 277–285.

Tsai, J. C., Goldman, C. K., & Gillespie, G. Y. (1995). Vascular endothelial growth factor in human glioma cell lines: induced secretion by EGF, PDGF-BB, and bFGF. *Journal of Neurosurgery*, 82(5), 864–873.

Unemori, E. N., Ferrara, N., Bauer, E. A., & Amento, E. P. (1992). Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 153(3), 557–562.

Wang, L. E. I., Zhang, L., Shen, W., Liu, Y., & Luo, Y. (2016, February). High expression of VEGF and PI3K in glioma stem cells provides new criteria for the grading of gliomas. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 11(2), 571–576

Wang, R., Chadalavada, K., Wilshire, J., Kowalik, U., Hovinga, K. E., Geber, A., Fligelman, B., Leversha, M., Brennan, C., & Tabar, V. (2010). Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature*, 468(7325), 829–833.

Wong, S. H., Hamel, L., Chevalier, S., & Philip, A. (2000). Endoglin expression on human microvascular endothelial cells association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF-beta signalling receptors. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5550–5560.

Xu, C., Wu, X., & Zhu, J. (2013). VEGF promotes proliferation of human glioblastoma multiforme stem-like cells through VEGF receptor 2. *ScientificWorldJournal*, 2013, 417413.

Yao, X., Ping, Y., Liu, Y., Chen, K., Yoshimura, T., Liu, M., Gong, W., Chen, C., Niu, Q., Guo, D., Zhang, X., Wang, J. M., & Bian, X. (2013). Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR-2) Plays a Key Role in Vasculogenic Mimicry Formation, Neovascularization and Tumor Initiation by Glioma Stem-like Cells. *PLoS ONE*, 8(3), 1–12.

Yu, Q., & Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & Development*, 14(2), 163–176.

Yue, W.-Y., & Chen, Z.-P. (2005). Does Vasculogenic Mimicry Exist in Astrocytoma? *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 53(8), 997–1002.

Zagzag, D., Amirnovin, R., Greco, M. A., Yee, H., Holash, J., Wiegand, S. J., Zabski, S., Yancopoulos, G. D., & Grumet, M. (n.d.). Vascular Apoptosis and Involution in Gliomas Precede Neovascularization: A Novel Concept for Glioma Growth and Angiogenesis. *Lab Invest*, 80(6), 837–849.

Zagzag, D., Lukyanov, Y., Lan, L., Ali, M. A., Esencay, M., Mendez, O., Yee, H., Voura, E. B., & Newcomb, E. W. (2006). Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest*, 86(12), 1221–1232.

Zheng, P.-P., van der Weiden, M., van der Spek, P. J., Vincent, A. J. P. E., & Kros, J. M. (2013). Intratumoral, not circulating, endothelial progenitor cells share genetic aberrations with glial tumor cells. *Journal of Cellular Physiology*, 228(7), 1383–1390.

Zustovich, F., Landi, L., Lombardi, G., Porta, C., Galli, L., Fontana, A., Amoroso, D., Galli, C., Andreuccetti, M., Falcone, A., & Zagonel, V. (2013). Sorafenib plus daily low-dose temozolomide for relapsed glioblastoma: a phase II study. *Anticancer Research*, 33(8), 3487–3494.

U citací označených \* se jedná o review.